

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

Application of Fluorescent Protein-Based
Indicators to Visual Analysis of Citric Acid
Production by *Aspergillus niger*

Aspergillus niger によるクエン酸生産の視覚的
解析への蛍光タンパク質インジケータの応用

申 請 者

Yuki	HONDA
本田	裕樹

応用化学専攻 応用生物化学研究

2011 年 12 月

クエン酸は、食品や飲料の酸味料として大量に利用され、工業的にも pH 調整剤やキレート剤などとして幅広い用途を有する。2010 年の世界的な生産量は年間 160 万トンに及び、その全量がクエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* (クロコウジカビ) によって発酵生産されている。*A. niger* は、多様な原料を利用可能であることや低 pH に耐性を示すなど他の微生物と比較して使用上の特長を備えており、生産性や収率の向上を目的として、*A. niger* のクエン酸生産機構に関する検討が進められている。とくに解糖系やトリカルボン酸 (TCA) 回路の諸酵素について遺伝子工学的な手法を駆使した解析が行われているが、クエン酸生産機構の全容は明らかにされていない。

一方、*A. niger* において遺伝子工学や代謝工学的な手法によって遺伝子機能を解析する際には、相同組換え効率の低さに起因する遺伝子の部位特異的な破壊が困難であることや、遺伝子発現量を簡便に解析する手法が必要とされることが課題となっていた。また、従来の *A. niger* による発酵現象の解析では、菌体量の変化や生産培地中の基質や生成物の増減など、発酵液全体を 1 つの集団として捉え解析する手法が採用されてきた。これに対して、多細胞真核微生物である *A. niger* において中間代謝産物であるクエン酸の蓄積や排出状況の変化を細胞レベルで解析し、多細胞から成る菌糸を基本的な集合体と捉えて検証することで新規かつ重要な知見が得られるはずである。すなわち、従来とは異なる視点からクエン酸生産機構を捉え直すことには重要な意義がある。

本論文では、クエン酸生産糸状菌 *A. niger* におけるクエン酸生産機構の解析への応用を目的として、効率的な遺伝子破壊系の構築と、蛍光タンパク質をインジケータとして用いた遺伝子発現やクエン酸の視覚的解析系を構築した。とくに、シアン非感受性呼吸系酵素遺伝子 (*aox1*) のストレス応答について蛍光タンパク質をインジケータとして用いて視覚的に解析した。また、クエン酸生産機構の視覚的解析に応用しうるクエン酸インジケータ蛍光タンパク質を作製した。

本論文は、9 章で構成されている。

第 1 章では、*A. niger* におけるクエン酸生産機構の解析に関する研究動向と課題について概説した。とくに効率的な遺伝子破壊や発現解析手法の必要性や、従来とは異なる視点から細胞ごとにクエン酸生産を理解することの重要性を指摘した。これらを背景として、本研究の意義と目的を明らかにした。

第 2 章では、本研究で用いた主な実験方法について概説した。すなわち、各種微生物の培養方法、*A. niger* などの糸状菌および大腸菌の遺伝子工学的な手法、遺伝子やタンパク質の分析方法ならびに代謝産物の分析方法について述べた。

第 3 章では、クエン酸生産糸状菌 *A. niger* WU-2223L において非相同組換えに関与する *ku80* ホモログ遺伝子 (*kueA*) を破壊することで、効率的な遺伝子破壊系を構築した。*Aspergillus* 属におけるホモログ遺伝子の塩基配列を参考に、*A. niger* WU-2223L 由来 *kueA* を取得した。*kueA* の 5' 末端から約 0.6 kb (断片 A)、約 0.9 kb

(断片 B)、約 1.1 kb (断片 C) を PCR で増幅し、マーカー遺伝子 *pyrG* と連結することで、*kueA* 破壊用カセット (5'-断片 B-*pyrG*-断片 A-断片 C-3') を作製した。この *kueA* 破壊用カセットを用いて、*A. niger* WU-2223L 由来 *pyrG* 欠損株を宿主として形質転換を実施し、*kueA* 破壊株を取得した。親株における相同組換え効率は約 10% であるのに対して、*kueA* 破壊株における相同組換え効率は約 70% に向上した。また、*kueA* 破壊株は *A. niger* WU-2223L と同等のクエン酸生産量を示し、クエン酸生産機構の解析研究に適用可能なことを示した。

第 4 章では、*A. niger* の分生子を用いて視覚的かつ簡便で定量的な遺伝子発現解析系を構築した。クエン酸生産との関連が示唆されるシアン非感受性呼吸系酵素 (AOX) 遺伝子 (*aox1*) を解析対象とし、とくに発現調節に関わる *aox1* の上流領域によるストレス応答について検証した。上流領域を含む *aox1* の下流に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を連結した融合遺伝子を導入した *A. niger* AOXEGFP-1 を供試菌とした。単核かつ単細胞の分生子を解析に供し、EGFP 融合 AOX の蛍光測光による *aox1* の数値的な発現解析を可能とした。*aox1* の上流領域にはストレス応答に関わる配列が存在し、40°C、1 時間の熱ショックおよび 1 mM paraquat (酸化剤) による酸化ストレス、0.5 M KCl による浸透圧ストレスを与えることで EGFP の蛍光が増加することを示した。以上より、*aox1* の上流領域が各種ストレスに応答することを明らかにした。また、この実例をもって、新規に構築した手法によって簡便に遺伝子の発現解析が可能であることを明らかにした。

第 5 章では、クエン酸を特異的に認識し蛍光強度が変化するクエン酸インジケータ蛍光タンパク質の作製方法について記述した。クエン酸と特異的に結合し構造変化する細菌由来 CitA のペリプラズムドメイン (CitA の 45-176 残基、CitAP) と、環状異性化変異を加えた EGFP (cpFP) を融合したキメラタンパク質 9 種類を作製した。CitAP において cpFP が挿入されたアミノ酸残基の番号に応じて CF97 から CF105 と命名した。CF97 から CF105 をそれぞれ His タグ融合タンパク質として取得し、クエン酸濃度を変化させた際の蛍光強度変化を測定した。まず、CF97 から CF105 すべてが緑色蛍光を示すことを確認した。この中で、CF98 と CF99 はクエン酸濃度変化に対して特に顕著な蛍光変化を示したことから、CF98 と CF99 を以後の検討に用いた。

第 6 章では、第 5 章で作製したクエン酸インジケータ蛍光タンパク質 CF98、CF99 について詳細に蛍光特性を評価した。評価項目は、クエン酸濃度依存性、クエン酸特異性、pH 依存性、金属イオンの影響、クエン酸との結合・乖離時間である。CF98 は、525 nm における蛍光強度を測定した際、413 nm と 504 nm に 2 つの励起スペクトルピークを示し、クエン酸濃度の上昇とともに 504 nm での蛍光強度 (FI504) が増大し、413 nm での蛍光強度 (FI413) が減少した。CF98 のクエン酸の認識範囲は 0.05-100 mM であった。一方、同様に CF99 は、413 nm と 504 nm の 2 つの励起スペクトルピークを示し、クエン酸濃度の上昇とともに FI504 が減

少し、FI413 nm が増大した。CF99 のクエン酸応答範囲は、0.05-5 mM であった。クエン酸認識の特異性を、ピルビン酸と TCA 回路の 7 種の有機酸について検討した。クエン酸以外の有機酸 (5 mM) による蛍光変化は観察されず、CF98、CF99 とともにクエン酸に特異的な蛍光インジケータとして機能することを明らかにした。一方、CF98、CF99 とともに pH の変化や Fe^{2+} 等の金属イオンの存在によって蛍光特性が変化することを確認した。クエン酸との結合あるいは乖離時間については、本研究での分析条件では迅速 (1 秒以内) に結合あるいは乖離することを明らかにした。以上より、CF98 と CF99 はクエン酸の濃度変化を検出することに適しており、クエン酸インジケータとしての性質を満たしていることを明らかにした。

第 7 章では、クエン酸インジケータ蛍光タンパク質としての CF99 を *in vitro* におけるクエン酸の検出に適用可能なことを実証した。精製した CF99 を用いて、*A. niger* によるクエン酸発酵液や果汁などのサンプル中のクエン酸濃度の定量試験を実施した。この際、従来法としての酵素法 (クエン酸リアーゼとリンゴ酸デヒドロゲナーゼを用いる手法) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた定量方法と比較した。各手法によって定量したクエン酸濃度はほぼ同値で、少なくともオーダーが変わる程の差違は認められなかった。作製したクエン酸インジケータ蛍光タンパク質を用いることで、*in vitro* において短時間かつ簡便にクエン酸を検出することが可能なことを示した。

第 8 章では、クエン酸インジケータ蛍光タンパク質としての CF98 と CF99 を *in vivo* におけるクエン酸の濃度変化の検出に適用可能であることを実証した。CF98 遺伝子を高発現させた大腸菌細胞を、破碎せずそのまま蛍光分光光度計に供し、CF98 由来の蛍光が得られることを確認した。当該大腸菌細胞に大腸菌由来クエン酸輸送体 CitT 遺伝子を共発現させ、細胞内のクエン酸濃度を容易に変化させることが可能な細胞を作製した。CF98 遺伝子のみを高発現した大腸菌細胞に対してクエン酸 2.5 mM を細胞外から添加した際、CF98 由来の蛍光は変化しなかった。一方、CF98 と CitT 遺伝子を共発現させた大腸菌細胞に対してクエン酸 2.5 mM を細胞外から添加した際、CF98 由来の蛍光は増大した。さらに、pH 蛍光指示薬を用いて、クエン酸の添加によって細胞内 pH が変化しないことを確認した。以上より、クエン酸の取り込みにより細胞内のクエン酸濃度が変化し、その濃度変化を CF98 によって検出可能なことを明らかにした。また、CF98 と CF99 遺伝子の *A. niger* における発現を確認した。以上より、クエン酸生産機構の解析に応用しうるクエン酸インジケータ蛍光タンパク質の作製に成功した。

第 9 章では、本研究を総括した。本研究では、*A. niger* の効率的な遺伝子破壊系や簡便な遺伝子発現解析系が構築され、とくに世界初のクエン酸インジケータ蛍光タンパク質が創製された。さらに、これらの成果の応用による今後の展望について記述した。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 本田 裕樹 印

(2011年11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
1. 論文 ○(報文)	1. Visual Expression Analysis of the Responses of the Alternative Oxidase Gene (<i>aox1</i>) to Heat Shock, Oxidative, and Osmotic Stresses in Conidia of Citric Acid-Producing <i>Aspergillus niger</i> Journal of Bioscience and Bioengineering, in press, 2011. <u>Yuki HONDA</u> , Takasumi HATTORI, and Kohtaro KIRIMURA
○(報文)	2. Increases in Gene-targeting Frequencies Due to Disruption of <i>kueA</i> as a <i>ku80</i> Homolog in Citric Acid-producing <i>Aspergillus niger</i> Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 75, No. 8, 1594-1596, August 2011. <u>Yuki HONDA</u> , Keiichi KOBAYASHI, and Kohtaro KIRIMURA
(報文)	3. Expression of Alternative Oxidase Gene (<i>aox1</i>) at the Stage of Single-Cell Conidium in Citric Acid-Producing <i>Aspergillus niger</i> Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 105, No. 2, 55-57, January 2008. Takasumi HATTORI, <u>Yuki HONDA</u> , Kuniki KINO, and Kohtaro KIRIMURA
2. 総説	なし
3. 講演	1. クエン酸生産糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> における oxaloacetate hydrolase 遺伝子 (<i>oahA</i>) の破壊と高発現によるシュウ酸生産経路の検証 第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス（東京），講演要旨集 p. 44, 2011 年 11 月. 小林慶一、 <u>本田裕樹</u> 、服部貴澄、桐村光太郎 2. <i>Aspergillus niger</i> NRRL 328 由来 III 型ポリケタイド合成酵素によるピロン化合物の生成 第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス（東京），講演要旨集 p. 73, 2011 年 11 月. 濱地達也、宮井希実、小林慶一、 <u>本田裕樹</u> 、桐村光太郎 3. 糸状菌由来の新規な III 型ポリケタイド合成酵素の遺伝子異種発現と機能解析 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム（つくば），講演要旨集 p. 56, 2011 年 9 月. 小林慶一、濱地達也、宮井希実、 <u>本田裕樹</u> 、桐村光太郎 4. Production of <i>p</i> -Aminosalicylic Acid by Regioselective Carboxylation through Enzymatic Kolbe-Schmitt Reaction Using Salicylic Acid Decarboxylase 4th Congress of European Microbiologists, FEMS 2011 (Geneva, Switzerland), Poster no. 113, June 2011. <u>Yuki HONDA</u> , Sachiyo KOSAKA, Yoshitaka ISHII, and Kohtaro KIRIMURA

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
3. 講演	<p>5. Disruption of <i>kueA</i> as a <i>ku80</i> Homolog in Citric Acid-Producing <i>Aspergillus niger</i> for Improvement of Homologous Recombination Frequencies 4th Congress of European Microbiologists, FEMS 2011 (Geneva, Switzerland), Poster no. 125, June 2011. Keiichi KOBAYASHI, <u>Yuki HONDA</u>, and Kohtaro KIRIMURA</p> <p>6. クロコウジカビ由来 III 型ポリケタイド合成酵素ホモログ遺伝子のクローニングと機能解析 日本化学会第 91 春季年会（神奈川）, 3B2-52, 2011 年 3 月. 宮井希実、小林慶一、<u>本田裕樹</u>、服部貴澄、桐村光太郎</p> <p>7. 酵母 <i>Trichosporon moniliiforme</i> における新規なサリチル酸分解経路に関与するサリチル酸脱炭酸酵素の性質 日本農芸化学会 2011 年度大会（京都）, 講演要旨集 p. 120, 2011 年 3 月. <u>本田裕樹</u>、小坂 祥代、桐村 光太郎</p> <p>8. <i>Aspergillus niger</i> 由来 III 型ポリケタイド合成酵素の基質特異性と反応生成物 日本農芸化学会 2011 年度大会（京都）, 講演要旨集 p. 278, 2011 年 3 月. 宮井希実、米原広海、<u>本田裕樹</u>、服部貴澄、桐村光太郎</p> <p>9. Enzymatic Production of <i>p</i>-Hydroxybenzoic Acid by para-site Specific Hydroxylation of Benzoic Acid through Whole Cell Reaction by <i>Trichosporon moniliiforme</i> The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, USA), Poster no. 228, December 2010. <u>Yuki HONDA</u>, Yusuke TSUTSUMI, Akihiro WATABE, Takasumi HATTORI, and Kohtaro KIRIMURA</p> <p>10. クエン酸生産糸状菌由来 <i>ku80</i> 破壊株における相同組換え効率の向上 第 10 回糸状菌分子生物学コンファレンス（広島）, 講演要旨集 p. 39, 2010 年 11 月. <u>本田裕樹</u>、小林慶一、桐村光太郎</p> <p>11. クエン酸生産糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> における <i>ku80</i> 遺伝子破壊による相同組換え効率の向上 第 9 回糸状菌分子生物学コンファレンス（東京）, 講演要旨集 p. 46, 2009 年 11 月. <u>本田裕樹</u>、小林慶一、服部貴澄、桐村光太郎</p> <p>12. クエン酸生産糸状菌におけるシアン非感受性呼吸系酵素の遺伝子破壊および遺伝子高発現 第 12 回日本化学会バイオテクノロジー部会シンポジウム（福岡）, 講演要旨集 p. 80, 2009 年 9 月. 服部貴澄、<u>本田裕樹</u>、桐村光太郎</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
3. 講演	<p>13. クエン酸生産糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> の分生子を利用したシアン非感受性呼吸系酵素遺伝子の視覚的なストレス応答解析 第 12 回日本化学会バイオテクノロジー部会シンポジウム（福岡），講演要旨集 p. 298, 2009 年 9 月. <u>本田裕樹</u>、服部貴澄、桐村光太郎、</p> <p>14. Visual Expression Analysis of Stress Responses of Alternative Oxidase Gene in Conidia of Citric Acid-Producing <i>Aspergillus niger</i> 3rd Congress of European Microbiologists, FEMS 2009 (Gothenburg, Sweden), Poster no. 82, June 2009. <u>Yuki HONDA</u>, Takasumi HATTORI, and Kohtaro KIRIMURA</p> <p>15. Overexpression and Disruption of Alternative Oxidase Gene in Citric Acid-Producing <i>Aspergillus niger</i> 3rd Congress of European Microbiologists, FEMS 2009 (Gothenburg, Sweden), Poster no. 80, June 2009. Takasumi HATTORI, <u>Yuki HONDA</u>, and Kohtaro KIRIMURA</p> <p>16. クエン酸生産糸状菌における alternative oxidase 遺伝子 (<i>aox1</i>) の熱ショック応答に関する EGFP を利用した視覚的解析 第 10 回日本化学会バイオテクノロジー部会シンポジウム（東京），講演要旨集 p. 86, 2007 年 9 月. 服部貴澄、<u>本田裕樹</u>、木野邦器、桐村光太郎</p> <p>17. クエン酸生産糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> の分生子における alternative oxidase 遺伝子 (<i>aox1</i>) の熱ショック応答の視覚的な発現解析 2007 年度日本生物工学会大会（広島），講演要旨集 p. 114, 2007 年 9 月. 服部貴澄、<u>本田裕樹</u>、木野邦器、桐村光太郎、</p> <p style="text-align: right;">他 19 件（合計 36 件）</p>
4. 著書 (共著)	<p>1. Citric Acid In: Murray Moo-Young, (ed.) Comprehensive Biotechnology, Second Edition, Vol. 3, pp. 135-142, September 2011. Kohtaro KIRIMURA, <u>Yuki HONDA</u>, and Takasumi HATTORI</p> <p>2. Gluconic and Itaconic Acids In: Murray Moo-Young, (ed.) Comprehensive Biotechnology, Second Edition, Vol. 3, pp. 143-147, September 2011. Kohtaro KIRIMURA, <u>Yuki HONDA</u>, and Takasumi HATTORI</p>
5. その他	なし